

International Conference 16th Ružička days  
"TODAY SCIENCE – TOMORROW INDUSTRY"  
September 21-23, 2016 / Vukovar, Croatia

## Zaštita okoliša / Environmental Protection

Izvorni znanstveni rad

### Obezbojenje sintetskih bojila na agarnim pločama odabranim gljivama

Natalija Velić<sup>1\*</sup>, Hrvoje Pavlović<sup>1</sup>, Mirjana Pavičić<sup>1</sup>, Antonija Kezerle<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek,  
F. Kuhača 20, 31 000 Osijek

<sup>2</sup> Vodovod-Osijek d.o.o., Poljski put 1, 31 000 Osijek, Hrvatska

\*Dopisni autor: natalija.velic@ptfos.hr

#### Sažetak

U ovom radu istražena je sposobnost obezbojenja sintetskih bojila (malahitno zelenilo MZ, kristal violet KV, fuksin F i metilensko modriilo MM) pomoću četiri vrste gljiva bijelog truljenja: *P. chrysosporium* CCBAS 570, *T. versicolor* CCBAS AG613, *T. versicolor* TV6 i *C. subvermispora*. Gljive su uzgajane pri 27 °C 9 (10) dana na agarnim pločama s dodatkom bojila u koncentracijama 50, 100 i 150 mg L<sup>-1</sup>. Zona rasta kolonija te zona obezbojenja (promjene boje) mjerene su (u dva međusobno okomita smjera) svaka 3 dana. MZ je snažno inhibiralo rast svih vrsta, ali su sve pokazale dobru sposobnost obezbojenja ovog bojila, što je vidljivo iz velikog indeksa obezbojenja (promjer obezbojenja/promjer kolonije) u rasponu od 2,42 do 6,04. Sposobnost djelomičnog obezbojenja KV pokazale su sve vrste gljiva, pri čemu je rast vrsta *P. chrysosporium* i *C. subvermispora* bio snažno inhibiran ovim bojom. F je inhibirao rast odabranih gljiva samo tijekom prvih dana uzgoja. Sposobnost obezbojenja F pokazale su sve vrste, ali indeks obezbojenja nije bio velik (0,24 – 1). Inhibicija rasta ovim bojom primijećena je samo u prvim danima uzgoja. MM nije inhibiralo rast gljiva, ali je djelomičnu sposobnost obezbojenja ovog bojila pokazala jedino vrsta *T. versicolor* TV6. Utvrđeno je kako primijenjene koncentracije bojila u podlozi statistički značajno utječu na rast kolonija gljiva, ali nije utvrđena statistički značajna razlika u sposobnosti obezbojenja.

**Ključne riječi:** sintetska bojila, *P. chrysosporium*, *T. versicolor*, *C. subvermispora*, obezbojenje

#### Uvod

Sintetska bojila ubrajaju se u skupinu vrlo opasnih onečišćujućih tvari, koje putem industrijskih otpadnih voda dospijevaju u okoliš. Većinom su organske prirode i aromatske strukture (benzenski i/ili naftalenski tip) (Gudelj i sur., 2011) te ulaze u skupinu ksenobiotičkih spojeva (Yu i Wen, 2005). Između ostalih svojstava, bojila moraju biti postojana i otporna na kemijsko i mikrobiološko djelovanje te na djelovanje svjetlosti, što za posljedicu ima njihovo dugo zadržavanje u okolišu, odnosno tešku razgradnju (Adedayo i sur., 2004). Njihovo uklanjanje iz okoliša zahtijeva primjenu složenih i dugotrajnih procesa. Bojila smanjuju prodiranje svjetlosti u vodu, što rezultira smanjenom koncentracijom kisika u vodotocima. Nadalje, ona djeluju toksično i genotoksično na vodene ekosustave te, također, pokazuju mutageni i kancerogeni učinak na ljude (Saratale i sur., 2011). Zbog svega navedenog, važno je ukloniti bojila iz obojenih otpadnih voda prije njihova ispuštanja u okoliš. Najčešće se za uklanjanje bojila iz otpadnih voda koriste fizikalno-kemijske metode poput adsorpcije, koagulacije, filtracije, kemijske razgradnje, primjene naprednih oksidacijskih procesa, itd. Primjena ovih metoda često je financijski, metodološki i vremenski vrlo zahtjevna, pri čemu se

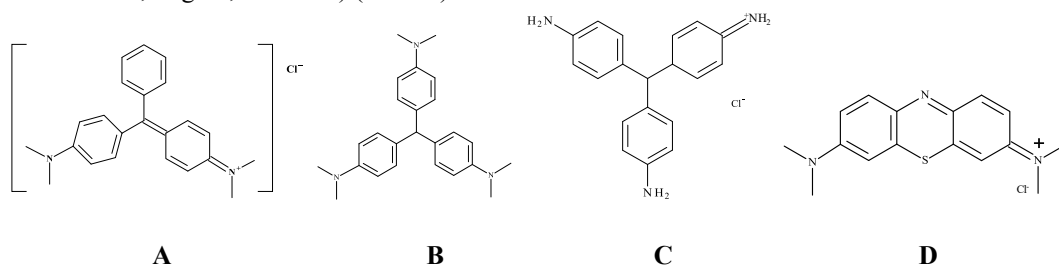
## Zaštita okoliša / Environmental Protection

nužno ne postiže visoka učinkovitost (Asgher i Bhatti, 2007; Sandhya i sur., 2005). Biološke metode predstavljaju alternativu fizikalno-kemijskim metodama i uključuju procese biosorpcije (adsorpcija bojila na živu ili inaktivnu biomasu mikroorganizama), biorazgradnje i biotransformacije te bioakumulacije. Osnovne prednosti primjene bioloških metoda su niska cijena, visoka učinkovitost, često potpuna biorazgradnja bojila ili nastajanje produkata manje toksičnosti od polaznog spoja. Osnovni nedostaci, u usporedbi s fizikalno-kemijskim metodama, su manja mogućnost kontrole i dugotrajnost bioprocesa, što je, još uvijek, prepreka široj primjeni ovih metoda na realnim sustavima (Gupta i Suhas, 2009). Mikroorganizmi koji se istražuju u ovu svrhu uključuju aerobne i anaerobne vrste bakterija, neke alge i velik broj različitih vrsta gljiva, koje su se pokazale najučinkovitijima za primjenu u bioremedijaciji obojenih otpadnih voda (Gupta i Suhas, 2009). Gljive bijelog truljenja skupina su mikroorganizama koja se najintenzivnije proučavaju u tu svrhu, ali i u druge svrhe poput razgradnje ksenobiotika, razgradnje lignoceluloloznih materijala s ciljem proizvodnje biogoriva, proizvodnje enzima, itd. (Eichlerová i sur., 2006; Forgacs i sur., 2004; Wesenberg i sur., 2003). Enzimski sustavi ovih gljiva, koji uključuju izvanstanične enzime odgovorne za razgradnju lignina, omogućuju im razgradnju različitih ksenobiotika poput policikličkih aromatskih ugljikovodika, polikloriranih bifenila, pesticida i sintetskih bojila (Elisashvili i sur., 2009). Najvažniji enzimi u procesu biorazgradnje bojila koje sintetiziraju ove vrste su enzimi uključeni u razgradnju lignina: lakaza, lignin peroksidaza i mangan peroksidaza (Santos i Corso, 2014; Eshghia i sur., 2011; Jayasinghe i sur., 2008). U ovom radu istražena je sposobnost obezbojenja sintetskih bojila malahitnog zelenila, kristal violeta, fuksina te metilenskog modrila pomoću četiri vrste gljiva bijelog truljenja *Phanerochaete chrysosporium* CCBAS 570, *Trametes versicolor* CCBAS AG613, *Trametes versicolor* TV6 i *Ceriporiopsis subvermispora* na agarnim pločama s dodatkom bojila u različitim koncentracijama, što je metoda koja se koristi za probir vrsta koje posjeduju potencijal za daljnju biotehnošku primjenu.

## Materijali i metode

### Bojila

U radu su korištena bojila malahitno zelenilo, fuksin, kristal violet i metilensko modrilo (sve Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska) (slika 1.).



**Slika 1.** Strukturne formule odabranih bojila: A) malahitno zelenilo, B) kristal violet, C) fuksin, D) metilensko modrilo

**Fig. 1.** Structural formulas of selected dyes: A) malchite green, B) crystal violet, C) fuchsin, D) methylene blue

### *Mikroorganizmi*

Istraživane su četiri vrste gljiva bijelog truljenja: *P. chrysosporium* 570 i *T. versicolor* AG 613 (Culture Collection of Basidiomycetes, Prag, Češka) te *T. versicolor* TV-6 i *C. subvermispora* (MZKI, Culture Collection of the National Institute of Chemistry Ljubljana, Slovenija). Gljive su održavane u Petrijevim zdjelicama na krumpirovom agaru i čuvane pri 4 °C u hladnjaku. Kao inokulum, u daljnjim pokusima obezbojenja bojila, korišteni su micelijski diskovi (promjera 6 mm) kulture stare 7 dana i uzgajane na 27 °C.

### *Istraživanje sposobnosti obezbojenja agarnih ploča*

Osnovne otopine istraživanih bojila pripremljene su odvagom 0,1 g bojila i dodatkom 3 mL sterilne demineralizirane vode u sterilnu epruvetu. Iz osnovnih su otopina preneseni odgovarajući volumeni otopljenih bojila u tikvice sa sterilnim krumpirovim agarom (Liofilchem, Italija) radi postizanja konačnih koncentracija bojila u hranjivim podlogama od 50 mg L<sup>-1</sup>, 100 mg L<sup>-1</sup> i 150 mg L<sup>-1</sup>. Podloge su razlivena u Petrijeve zdjelice promjera 90 mm i nacijepljene micelijskim diskovima promjera 6 mm kultura starih 7 dana. Kao abiotička kontrola korištene su nenacijepljene obojene hranjive podloge, dok je kao biotička kontrola korištena hranjiva podloga bez dodatka bojila i nacijepljena na isti način kao obojene podloge. Sve Petrijeve zdjelice inkubirane su pri 27 °C kroz 9 (10) dana. Rast kolonije i promjer zone obezbojenja su mjereni u 2 međusobno okomita smjera, svaka tri dana. Dobiveni rezultati su izraženi kao indeks obezbojenja (promjer zone obezbojenja/promjer micelija) i statistički obrađeni programima GraphPad Prism ver. 6 i Microsoft Excel 2013.

## **Rezultati i rasprava**

Sposobnost obezbojenja bojila na agarnim pločama s odabranim bojilima izražena kao indeks obezbojenja prikazana je u tablici 1. Indeks obezbojenja izražen je kao omjer promjera obezbojenja (mm) i promjera kolonije (mm) izmjerenog 9., odnosno 10. dana uzgoja. Veći indeks obezbojenja ukazuje na bolju sposobnost gljive za razgradnju bojila (Jayasinghe i sur., 2008), ali pri razmatranju indeksa obezbojenja valja voditi računa i o brzini rasta mikroorganizma (inhibiciji rasta zbog dodatka bojila). Veliki indeks obezbojenja, uz istovremenu snažnu inhibiciju rasta, rezultirat će obezbojenjem tek dijela ukupne površine obojene agarne ploče. Do potpunog obezbojenja cijele površine agarnih ploča za većinu bojila došlo je tek nakon 20 do 30 dana uzgoja, dok pri najvećoj koncentraciji bojila do potpunog obezbojenja nije došlo.

Indeks obezbojenja određen nakon 9, odnosno 10 dana uzgoja omogućuje probir onih vrsta koje će brže i učinkovitije provesti razgradnju bojila. Iz rezultata prikazanih u tablici 1. vidljivo je da su svi mikroorganizmi tijekom 9 odnosno 10 dana uzgoja, do određene mjere obezbojili bojila iz skupine trifenilmetanskih bojila – malahitno zelenilo, fuksin i kristal violet. Pri tome je obezbojenje malahitnog zelenila najučinkovitije, što se vidi iz izrazito velikog indeksa obezbojenja. Malahitno zelenilo ujedno je i bojilo koje je najjače inhibiralo rast svih gljiva. Eichlerová i sur. (2006a, 2006) istraživali su sposobnost obezbojenja agrarnih ploča s dodatkom malahitnog zelenila pomoću gljiva bijelog truljenja *Dichomitus squalens*, *P. chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus* i *T. versicolor*. Koncentracije malahitnog zelenila u podlozi iznosile su od 50 do 1000 mg L<sup>-1</sup>, što je dovelo do potpune inhibicije rasta.

**Zaštita okoliša / Environmental Protection**

**Tablica 1.** Obezbojenje različitih bojila pomoću gljiva bijelog truljenja  
**Table 1.** Decolourisation of different dyes using white rot fungi

		Malahitno zelenilo	Fuksin	Kristal violet	Metilensko modrilo
Mikroorganizam	$\gamma_{\text{bojilo}}/\text{mg L}^{-1}$	Indeks obezbojenja			
<i>P. chrysosporium</i> CCBAS 570	50	4,40	1,00	4,44	0,00
	100	4,44	0,42	4,46	0,00
	150	4,30	0,00	4,45	0,00
<i>T. versicolor</i> CCBAS AG613	50	2,42	0,69	1,55	0,00
	100	2,94	0,49	1,57	0,00
	150	3,44	0,58	1,52	0,00
<i>T. versicolor</i> TV6	50	3,01	0,73	1,04	0,52
	100	6,01	0,65	1,02	0,27
	150	5,43	0,60	1,19	0,37
<i>C. subvermispora</i>	50	5,31	0,24**	2,92	0,00
	100	6,04	na***	3,03	0,00
	150	5,77	na***	3,62	0,00
* indeks obezbojenja izražen kao promjer obezbojenja/promjer kolonije 9. dana uzgoja, odnosno 10. dana uzgoja za <i>P. chrysosporium</i> i <i>T. versicolor</i> AG 613 na malahitnom zelenilu i metilenskom modrilu ** 3. dan uzgoja *** na (eng. <i>not applicable</i> ) nije bilo moguće očitati promjer obezbojenja					

Izuzetak je bila gljiva *D. squalens* za koju je primijećen vrlo spor rast i obezbojenje agarnih ploča pri najmanjoj koncentracije malahitnog zelenila u podlozi. Jayasinghe i sur. (2008) također su zabilježili potpuni izostanak rasta na agarnim pločama s malahitnim zelenilom ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) u slučaju 4 od 10 vrsta gljiva bijelog truljenja koje su istraživali, dok su ostale rasle značajno sporije od kontrola, ali su pokazale dobru sposobnost obezbojenja agarnih ploča, što je u skladu s rezultatima dobivenima ovim istraživanjem. Iz tablice 1. nadalje je vidljivo da su odabrane gljive učinkovito obezbojile kristal violet. Manje vrijednosti indeksa obezbojenja u odnosu na malahitno zelenilo, djelomično su posljedica činjenice da je inhibicija rasta ovim bojom bila manja. Izuzetak je gljiva *C. subvermispora* za koju je vidljivo kako je indeks obezbojenja vrlo visok za sve koncentracije kristal violeta te je ova gljiva ujedno bila i najjače inhibirana dodatkom kristal violeta u podlogu. U sličnom istraživanju koje su proveli Eichlerová i sur. (2006) dodatak kristal violeta u podloge na kojima su uzgajane gljive *P. chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus* i *T. versicolor* u koncentracijama od 100 i  $500 \text{ mg L}^{-1}$  imao je za posljedicu inhibiciju rasta ili potpuni izostanak rasta ovih gljiva. U koncentraciji  $50 \text{ mg L}^{-1}$  kristal violet je uzrokovao usporeni rast, ali je došlo do obezbojenja podloge. Fuksin je bojilo koje su sve gljive tijekom ovog istraživanja obezbojile do određene mjere, ali je učinkovitost obezbojenja bila nešto manja u odnosu na druga dva bojila iz iste skupine. Jedina gljiva koja je tijekom 10. dana uzgoja pokazala sposobnost obezbojenja metilenskog modrila je *T. versicolor* TV6. Pri tome je vidljiva zona obezbojenja primijećena tek između 6. i 9. dana uzgoja, za razliku od svih ostalih bojila kada je obezbojenje primijećeno već između 2. i 3.

dana uzgoja (rezultati nisu prikazani). Indeks obezbojenja manji od 1 ukazuje na slabiju sposobnost obezbojenja metilenskog modrila pomoću ove gljive u odnosu na sposobnost obezbojenja drugih bojila. Ovo je posebice očigledno kada se uzme u obzir činjenica kako dodatak metilenskog modrila u podloge nije rezultirao značajnijom inhibicijom rasta u odnosu na kontrolu. Kako je metilensko modrilo teško biorazgradljivo bojilo pokazuje i istraživanje Jayasinghe i sur. (2008) u kojem su samo 2 od 10 korištenih gljiva bijelog truljenja pokazale dobru sposobnost obezbojenja metilenskog modrila, odnosno indeks obezbojenja veći od 1. Pri tome je dodatak metilenskog modrila u podlogu za posljedicu imao umjeren do jak inhibični učinak na rast odabranih 10 vrsta gljiva bijelog truljenja.

Statistička obrada rezultata rasta kolonija istraživanih gljiva na agarnim pločama s dodatkom bojila ukazuje na sljedeće: bojila djeluju inhibično na rast kolonija gljiva, pri čemu veće koncentracije bojila inhibiraju rast kolonija u većoj mjeri (rezultati nisu prikazani). Gotovo redovito je promjer kolonije kontrolnih uzoraka (bez dodatka bojila u podlogu) veći, u usporedbi s promjerom kolonije koja raste na bojilima, što je potvrđeno statističkim testom analize varijance ANOVA uz post-hoc Bonferroni-ijev test utvrđivanja razlike između podataka. No, kako kolonije gljiva rastu, tako se i razlika u porastu kontrolnih uzoraka i uzoraka s bojilima smanjuje. Za pretpostaviti je kako se gljiva prilagođava supstratu te, nakon izvjesnog vremena prilagodbe, rast završava slično kao i kontrolni uzorak, bez bojila. S druge strane, većinom nema statistički značajne razlike između obezbojenja ploča s bojilima bez obzira na tri različite koncentracije bojila. Iako je rast gljiva inhibiran dodatkom bojila, čini se kako istražene koncentracije bojila nisu utjecale i na smanjenje ekspresije enzima koji su odgovorni za obezbojenje.

## Zaključci

Na osnovu rezultata istraživanja može se zaključiti kako odabrane gljive bijelog truljenja, zbog pokazane sposobnosti potpunog ili djelomičnog obezbojenja korištenih bojila, imaju potencijal za korištenje u bioremedijaciji obojenih otpadnih voda. Nadalje, rezultati također upućuju na potrebu daljnjih istraživanja kako bi se ispitao utjecaj većih koncentracija bojila na rast kolonija i sposobnost obezbojenja bojila.

## Literatura

- Adedayo, O., Javadpour, S., Taylor, C., Anderson, W.A., Moo-Young, M. (2004): Decolourization and detoxification of methyl red bay aerobic bacteria from a wastewater treatment plant, *World J Microbiol Biotechnol.* 20, 545-550.
- Asgher, M., Bhatti, H.N. (2007): Decolorization potential of mixed microbial consortia for reactive and disperse textile dyestuffs, *Biodegradation* 18, 311-316.
- Eichlerová, I., Homolka, L., Nerud, F. (2006): Synthetic dye decolorization capacity of white rot fungus *Dichomitus squalens*, *Bioresource Technol.* 97, 2153-2159.
- Eichlerová, I., Homolka, L., Nerud, F. (2006a): Evaluation of synthetic dye decolorization capacity in *Ischnoderma resinosa*, *J. Ind. Microbiol. Biot.* 33, 759-766.

- Elisashvili, V., Kachlishvili, E., Tsiklauri, N., Metreveli, E., Khardziani, T., Agathos, S.N. (2009): Lignocellulose-degrading enzyme production by white-rot Basidiomycetes isolated from the forests of Georgia, *World J Microbiol Biotechnol.* 25, 331-339.
- Eshghia, H., Alishahib, Z., Zokacib, M., Daroodia, A., Tabasib, E. (2011): Decolorization of methylene blue by new fungus: *Trichaptum biforme* and decolorization of three synthetic dyes by *Trametes hirsuta* and *Trametes gibbosa*, *Eur. J. Chem.* 2, 463-468.
- Forgacs, E., Cserhati, T., Oros, G. (2004): Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review, *Environ Int.* 30, 953-971.
- Gudelj, I., Hrenović, J., Landeka Dragičević, T., Delaš, F., Šoljan, V., Gudelj, H. (2011): Azo boje, njihov utjecaj na okoliš i potencijal biotehnoške strategije za njihovu biorazgradnju i detoksifikaciju, *Arh Hig Rada Toksikol.* 62, 91-101.
- Gupta, V.K., Suhas (2009): Application of low-cost adsorbents for dye removal--a review, *J Environ Manage.* 90, 2313-2342.
- Jayasinghe, C., Imtiaj, A., Lee, G.W., Im, K.H., Hur, H., Lee, M.W., Yang, H.S., Lee, T.S. (2008): Degradation of three aromatic dyes by white rot fungi and the production of ligninolytic enzymes, *Mycobiology* 36, 114-120.
- Sandhya, S., Padmavathy, S., Swaminathan, K., Subrahmanyam, Y.V., Kaul, S.N. (2005): Microaerophilic-aerobic sequential batch reactor for treatment of azo dyes containing simulated wastewater, *Process Biochem.* 40, 885-90.
- Santos, G.C., Corso, C.R. (2014): Comparative Analysis of Azo Dye Biodegradation by *Aspergillus oryzae* and *Phanerochaete chrysosporium*, *Water Air Soil Pollut.* 225, 2026.
- Saratale, R.G., Saratale, G.D., Chang, J.S., Govindwar, S.P. (2011): Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers.* 42, 138-157.
- Wesenberg, D., Kyriakides, I., Agathos, S.N. (2003): White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents, *Biotechnol. Adv.* 22, 161-187.

Original research paper

## Synthetic dyes decolourisation on agar plates by selected fungi

Natalija Velic<sup>1\*</sup>, Hrvoje Pavlović<sup>1</sup>, Mirjana Pavičić<sup>1</sup>, Antonija Kezerle<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Food Technology Osijek,  
F. Kuhača 20, 31 000 Osijek, Croatia

<sup>2</sup>Vodovod-Osijek d.o.o., Poljski put 1, 31000 Osijek, Croatia

\*Corresponding author: natalija.velic@ptfos.hr

### Summary

Four white rot fungi *P. chrysosporium* CCBAS 570, *T. versicolor* CCBAS AG613, *T. versicolor* TV6 and *C. subvermispora* were tested for their ability to decolourise synthetic dyes (Malachite Green MG, Crystal Violet CV, Fuchsin F and Methylene Blue MB). Fungal species were cultivated at 27 °C for 9 (10) days on Potato dextrose agar plates containing dyes at final concentrations of 50, 100 and 150 mg L<sup>-1</sup>. The colony radial growth and the decolourisation zone (in two perpendicular directions) were measured every three days. Although all fungal strains were strongly inhibited by MG, high decolourisation index (decolourisation diameter/mycelial diameter) ranging from 2.42 to 6.04 for all tested species indicated very good decolourisation ability. CV strongly inhibited the growth of all fungi except *P. chrysosporium*. However, all species partially decolourised CV. F was also decolourised by all strains but the decrease in decolourisation efficiency was observed (decolourisation index ranging from 0.24 to 1). Inhibitory effect of F to fungal growth was observed only during the first cultivation days. Only *T. versicolor* TV6 partially decolourised MB, even though this dye did not inhibit the mycelial growth of the tested fungal strains. The influence of agar plate dye concentration on fungal growth was statistically significant, while no statistical significance was observed regarding the decolourisation ability.

**Keywords:** synthetic dyes, *P. chrysosporium*, *T. versicolor*, *C. subvermispora*, decolourisation